

haben als nicht diabetische. Eine statistische Auswertung ist aber bei der vorläufig noch geringen Zahl von Probanden nicht sinnvoll.

Diskussion

Nimmt man 1 cm Schreiber Ausschlag als Grenze für genaue Ablesbarkeit, so liegt die untere Nachweisgrenze bei Verwendung von je 0,2 ml Blut für die Bestimmung von Acetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure bei 0,016 bzw. 0,017 μ Mol Acetessigsäure bzw. β -Hydroxybuttersäure pro ml Blut. Nimmt man 0,1 ml Blut für die Bestimmung beider Ketonkörper, so liegt die untere Nachweisgrenze bei 0,052 μ Mol Acetessigsäure bzw. 0,057 μ Mol β -Hydroxybuttersäure pro ml Blut. Die Daten in Tabelle 4 zeigen, daß die Ketonkörperspiegel bei den meisten Diabetikern trotz guter Einstellung über diesen Grenzwerten liegen, bei nicht diabetischen Personen jedoch darunter. Daraus ergibt sich, daß für die klinische Kontrolle des Verlaufs einer Ketoacidose

0,1 ml Blut für die Bestimmung beider Ketonkörper genügen. Wird die Nachweisgrenze unterschritten, so sind die Werte nicht mehr als pathologisch zu bezeichnen. Lediglich für die Untersuchung des normalen Ketonkörperspiegels sind für die Bestimmung von Acetessigsäure und β -Hydroxybuttersäure je 0,2 ml Blut erforderlich.

Ein kritischer Faktor ist der pH-Wert des Bestimmungsansatzes. Er soll bei der Bestimmung von Acetessigsäure zwischen 6,9 und 7,2 liegen, bei der Bestimmung von β -Hydroxybuttersäure zwischen 9,0 und 9,5. Will man die in der Methode angegebenen Volumina oder Konzentrationen ändern, so muß streng darauf geachtet werden, daß die erforderlichen pH-Werte im Bestimmungsansatz erreicht werden.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit durch eine Sachbeihilfe. Herrn Oberarzt Priv. Doz. Dr. Prellwitz, II. Med.-Univ.-Klinik Mainz, danken wir für die Blutproben der in Tabelle 4 aufgeführten Patienten.

Literatur

1. BERGMAYER, H. U. und E. BERNT, *Enzymol. biol. clin.* 5, 65 (1965). — 2. WILLIAMSON, D. H., J. MELLANBY und H. A. KREBS, *Biochem. J.* 82, 90 (1962). — 3. LJUNGGREN, G., *Biochem. Z.* 145, 422 (1924). — 4. BERGMAYER, H. U., in: H. U. BERGMAYER, *Methoden der Enzymatischen Analyse* S. 37; Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962).

Professor Dr. K. H. Bässler
65 Mainz, Postfach 606

Fermente des menschlichen Blutes

XVI. Mitteilung¹⁾: Beziehung zwischen Fettstoffwechsel und Benzoylcholin spaltung im menschlichen Vollserum

Von W. PILZ²⁾ und E. STELZL

Aus dem Physiologisch-Chemischen und Analytischen Laboratorium (Leiter: Dr. W. Pilz) der Ärztlichen Abteilung (Leiter: Dr. H. Hörlein) der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Leverkusen

(Eingegangen am 16. Mai 1967)

Vor kurzem konnten wir feststellen, daß sich bei Patienten mit *essentieller* Hyperlipämie und *essentieller* Hypercholesterinämie oder allgemein arteriosklerotischer Stoffwechsellaage bei der Hydrolyse von Benzoylcholin zwei, drei oder mehr pH-Optima ausbilden. In der vorliegenden Arbeit werden Experimente beschrieben, in denen das Serum junger gesunder Versuchspersonen (Ausgangsmaterial) mit etwa 10 g% Neutralfett (als Maisöl) künstlich beladen wird. In zeitlichen Abständen wird das pH-Optimum vor und in verschiedenen Zeitabständen nach Fettbeladung festgestellt. Gleichzeitig wurde das Ausgangsmaterial in derselben Weise untersucht. Außerdem wurden Serumanalysen der gesamten veresterten Fettsäuren, der endogenen Lipoproteidlipase³⁾, der Arylesterase³⁾ und des Gesamtcholesterins durchgeführt sowie jeweils die Dibucainzahl⁴⁾ bestimmt. Alle Untersuchungen wurden sowohl in dem mit Fett beladenen als auch in dem nicht mit Fett beladenen Ausgangsmaterial in etwa denselben zeitlichen Abständen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß sich bei der Hydrolyse von Benzoylcholin bereits am 1. Tag nach der Fettbeladung mindestens vier pH-Optima ausgebildet hatten, mit zunehmender Zeit nahm die Anzahl der pH-Optima zu. In dem nicht mit Fett beladenen Serum blieb die Lage des pH-Optimums gleich, es bilden sich keine weiteren pH-Optima aus. Wird statt Benzoylcholin Acetylcholin als Substrat verwendet, treten weder in dem Versuch mit noch in dem Versuch ohne Fettbeladung mehrere pH-Optima auf. Wie die Serumanalysen zeigen, kommt bereits nach kurzer Zeit sowohl die endogene Lipoproteidlipase als auch ihr Cofermentsystem, die Arylesterase, zum Erliegen. Bei dem nicht mit Fett beladenen Ansatz bleibt die Aktivität der beiden Enzymsysteme bis zum Versuchsende praktisch konstant. Bei der Untersuchung mit Fettbeladung sank die Dibucainzahl (DN) im Vergleich zum Ausgangsmaterial (DN = 81) bereits innerhalb einer Stunde auf einen Wert von DN = 46, um dann konstant zu bleiben. Die in gleicher Weise durchgeführte Analyse des Ausgangsmaterials (Werte, die als Leerwerte angesehen werden können) zeigen, daß die Dibucainzahl praktisch konstant bleibt. Innerhalb von 8 Tagen nahm bei dem Versuch mit Fettbeladung die Menge der gesamten veresterten Fettsäuren um 510 mg% ab, während sie im gleichen Zeitraum im Ausgangsmaterial nur um 48 mg% absank. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten mehrerer pH-Optima in dem Versuch mit Fettbeladung und der früher beschriebenen Existenz von 11 verschiedenen Benzoylcholin hydrolysierenden Enzymen im menschlichen Serum wird diskutiert.

¹⁾ Letzte Mitteilung: PILZ, W. und A. T. BOO, diese Z. 5, 173 (1967).

²⁾ Auszugsweise vorgetragen bei der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Biologische Chemie in Marburg, Oktober 1966.

³⁾ Die Trivialnamen Lipoproteidlipase und Arylesterase werden hier gebraucht für die Enzyme: Glycerol ester hydrolase (E. C. 3.1.1.3) und Aryl ester hydrolase (E. C. 3.1.1.2).

⁴⁾ Abkürzungen: DN = Dibucainzahl; CE = Clearing Enzyme = Lipoproteidlipase; Tris = Trishydroxymethylaminomethan.

We recently showed that in the presence of *essential* hyperlipaemia and *essential* hypercholesterolaemia, or a general metabolic disposition to atherosclerosis, the hydrolysis of benzoylcholine by the serum shows two, three or more pH optima. In the present work experiments are described in which the serum of young healthy persons (= starting material) was artificially loaded with about 10% neutral fat (as maize oil). The pH optimum was determined before and at varying time intervals after fat loading. The serum was also analysed for total esterified fatty acids, endogenous lipoprotein lipase, aryl esterase and total cholesterol, and some measurements were made of the dibucaine number. All the measurements were made on both fat-loaded and on starting material from untreated subjects at about the same time intervals. It was found that one day after fat loading, at least four pH optima for the hydrolysis of benzoyl choline had already appeared. The number of pH optima increased with time. In the serum from untreated persons, the position of the pH optimum remained constant, and no further pH optima were found. If benzoylcholine was replaced by acetylcholine as the substrate, there was no increase in the number of pH optima, either with or without fat loading. The serum analyses showed that the endogenous lipoprotein lipase, as well as its coenzyme system the aryl esterase decreases rapidly and markedly. Both of these enzyme systems remained practically constant to the end of the experiment in the untreated controls. In fat-loading, the dibucaine number (DN) decreased within half an hour from DN = 81 (starting material) to DN = 46, and then remained constant. In the untreated controls, the dibucaine number of the starting material remained practically constant. Within 8 days after fat-loading, the level of total esterified fatty acids decreased by 510 mg.%, while the starting material from the untreated controls decreased by only 48 mg.% in the same time. The relationship between the appearance of several pH optima during fat-loading and the previously described existence of 11 different enzymes for the hydrolysis of benzoyl choline in human serum is discussed.

Acetylcholin wird von menschlichem Vollserum in hohem Maße enzymatisch hydrolysiert. Das pH-Optimum der Reaktion liegt zwischen pH 7,9 und pH 8,4 (2). Dieser Befund wurde sowohl mit Tris-Essigsäure- als auch mit Veronal-Puffer erhoben.

Wir stellten damals fest (2), daß die Hydrolyse von Benzoylcholin dasselbe Kurvenbild liefert, sofern es sich um gesunde Versuchspersonen handelt. Bei Patienten mit signifikant erhöhten Werten für die gesamten veresterten Fettsäuren, den Serumcholesterinspiegel und einer signifikant erniedrigten endogenen Lipoproteidlipase (Clearing Enzyme = CE) traten je nach Schwere des Krankheitsbildes zwei oder mehr pH-Optima (zwischen pH 6,8 und pH 9,2) für die Hydrolyse von Benzoylcholin im Vollserum auf. Wir haben inzwischen etwas mehr als 120 Patienten untersucht und diese Anomalie in allen Fällen gefunden, während wir bei gesunden Versuchspersonen in keinem Fall Abweichungen dieser Art feststellen konnten.

In Verfolgung dieser Befunde haben wir Serum von jungen gesunden Versuchspersonen künstlich mit etwa 10 g% Neutralfett beladen und in Abhängigkeit von der Zeit die Veränderungen in den pH-Optima für die Hydrolyse von Benzoylcholin und Acetylcholin verfolgt. Gleichzeitig wurde dasselbe Serum, jedoch ohne Fettbeladung, in gleicher Weise untersucht. Außerdem wurden in den Seren nach und ohne Fettbelastung in zeitlichen Abständen analytische Untersuchungen durchgeführt.

Methodik

Serum wurde von gesunden jungen Versuchspersonen durch Punktion der *Vena cubitalis* und Zentrifugieren gewonnen. Dieses Serum (insgesamt etwa 500 ml) wird in Hinkunft als „Ausgangsmaterial“ bezeichnet. Zur Fettbeladung wurde ein Teil des Ausgangsmaterials (200 ml) mit 20 g Maisöl (Mazola) im Mixer bei höchster Drehzahl gemischt. Das Material wurde in einem mit Schliffstopfen verschließbaren Kolben aufbewahrt. Der größte Teil des Öles blieb im Schwebestand, nur ein kleiner Teil setzte sich am Boden ab. Vor jeder Serumentnahme wurde von Hand kräftig durchgeschüttelt, wodurch der Inhalt vollkommen homogen wurde, was durch fünffache Bestimmung der gesamten veresterten Fettsäuren (die vor jeder Analyse durchgeführt wurden) bewiesen wurde. Zunächst wurde das Ausgangsmaterial (vor Fettbeladung) und dann das Material 1 Std., 2 Std., am 1., 3., 6., 7. und 8. Tag nach Fettbeladung analysiert sowie der Rest des Ausgangsmaterials

am 1., 3., 6., 7. und 8. Tag nach Versuchsbeginn. pH-Variationen wurden gleichzeitig im Ausgangsmaterial und dann nach Fettbeladung am 1., 2., 3., 6., 7. und 8. Tag sowie im Ausgangsmaterial (ohne Fettbeladung) am 1., 3., 6., 7. und 8. Tag nach Versuchsbeginn durchgeführt. Im allgemeinen wurden zwischen pH 6,8 und pH 9,2 mindestens 40 Puffer verschiedener pH-Werte verwendet, um die Ausbildung neuer pH-Optima exakt verfolgen zu können. Dabei wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, die nicht mehr als $\pm 0,2 \mu\text{Äquiv.}$ voneinander abweichen durften. Substrate waren Benzoylcholin und Acetylcholin. Dieselben Forderungen (Doppelbestimmungen und Fehlergrenze) wurden für die im folgenden beschriebenen analytischen Methoden gefordert.

Als Puffersysteme dienten Tris-Essigsäure- (3) und Veronal-Puffer nach Michaelis, beide 0,1M. Zur Bestimmung der gesamten veresterten Fettsäuren wurde Serum mit der 100fachen Menge einer Mischung aus Alkohol/Aceton 1:1 enteiweißt, bis zum leichten Sieden erwärmt und das Volumen nach dem Abkühlen korrigiert. Anschließend wurde in Zentrifugenröhrchen mit eingeschlipfem Stopfen zentrifugiert, ein aliquoter Teil des Überstandes in einen 50 ml fassenden Meßkolben pipettiert und bei Zimmertemperatur im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde mit Äther/Äthanol 1:4 aufgenommen und die Ester nach (4) photometrisch als Eisen(III)-Hydroxamate bestimmt. Legt man ein mittleres Mol.-Gew. der Fettsäuren von 277 zugrunde, läßt sich die Konzentration der gesamten veresterten Fettsäuren errechnen. Cholesterinbestimmungen wurden nach der Methode von ZACK (5) in der von uns angegebenen Modifikation (6) (vgl. (7)) durchgeführt. Die endogene Lipoproteidlipase (CE) wurde nach (8), die Arylesterase nach (9) mit β -Naphthylpropionat als Substrat bestimmt.

Die Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse von Benzoylcholin wurde nach (10) mit einem Vergleichswert (ohne biologischem Material) und zwei Meßwerten (mit biologischem Material) durchgeführt. Da bei dieser Art der Bestimmung in den Vergleichswerten das Substrat mitbebrütet wird, fällt die erhebliche Eigenverseifung von Cholinestern während der Bebrütung (Einzelheiten vgl. (11)) bei der Berechnung heraus und geht nicht in das Resultat ein. Die Dibucainzahlen wurden nach KALOW und Mitarbeiter (12) (UV-Test mit Benzoylcholin als Substrat) bestimmt.

Tab. 1

Serumanalyse von Patienten mit mehreren pH-Optima für die Benzoylcholinspaltung (Nüchternwerte) sowie Vergleichswerte von gesunden Versuchspersonen

| | Patienten mit pH-Anomalie (120 Fälle) | Normalwerte (120 Fälle) (Keine pH- Anomalie) |
|--|---|---|
| Gesamte veresterte Fettsäuren (mg 100 ml) | 800—2000 | < 450 |
| Gesamt-Cholesterin (mg 100 ml) | 350—800 | < 200 |
| Endogene Lipoproteidlipase ($\mu\text{Äquiv.}/\text{ml}/\text{Min.}$) | 3,5—7,0 | 17,5—21,0 |
| Arylesterase ($\mu\text{Äquiv.}/\text{ml}/\text{Min.}$) | 2,3—3,3 | 2,3—4,6 |
| Dibucainzahl (DN) | 40—60 | um 80 |

Ergebnisse

Patienten mit *essentieller* Hyperlipämie und *essentieller* Hypercholesterinämie oder allgemein arteriosklerotischer Stoffwechsellaage zeigen stets zwei oder mehr pH-Optima bei der Benzoylcholinspaltung, entsprechend (2). Mittelwerte von je 120 Patienten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Von dem künstlich mit Fett beladenen Serum wurde 1 Std., am 1., 2., 3., 6., 7. und 8. Tag nach Fettbelastung

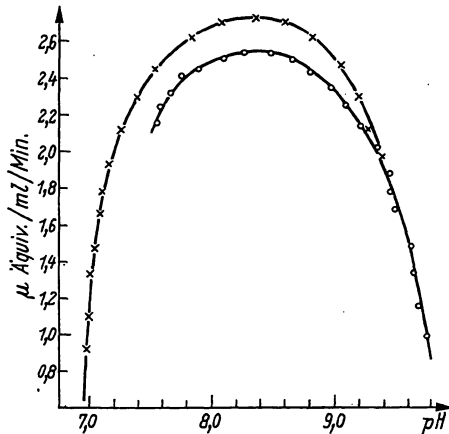


Abb. 1

Hydrolyse von Benzoylcholin durch menschliches Serum: pH-Optimum des Ausgangsmaterials (vor Fettbelastung)

x—x Tris-Essigsäure-Puffer
o—o Veronalpuffer

eine Serumanalyse entsprechend Tabelle 1 und gleichzeitig eine pH-Variation mit Benzoylcholin und Acetylcholin als Substraten durchgeführt. Die Serumanalysen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt, die entsprechenden pH-Variationen mit Benzoylcholin als Substrat in Abbildung 1 und 2a—f) wiedergegeben. Verwendet man als Substrat Acetylcholin, wird im Ausgangsmaterial nur *ein* pH-Optimum erhalten (2). Nach Fettbelastung wird weder die Lage des Optimums geändert noch bilden sich andere Optima aus. Die Absoluthöhe der Enzymaktivität ist am 8. Tag um 9,8% kleiner als im Ausgangsmaterial.

In dem *nicht* mit Fett beladenen Teil des Ausgangsmaterials wurden während der Dauer des Versuches Serumanalysen (zusammengestellt in Tab. 2) durchgeführt sowie die pH-Optima für die Benzoyl- und Acetylcholinspaltung festgestellt. Für beide Substrate wurde vom Anfang bis Versuchsende nur *ein* pH-Optimum, das stets an derselben Stelle lag, gefunden, weshalb auf eine gesonderte Wiedergabe verzichtet werden kann.

Diskussion

Wie wir bereits früher feststellen konnten, besteht eine Abhängigkeit zwischen der Höhe der Enzymaktivität und dem verwendeten Puffer (13, 2). Diese Beziehung wurde in jüngster Zeit unter Verwendung von Reinenzymen aus menschlichem Serum und vier verschiede-

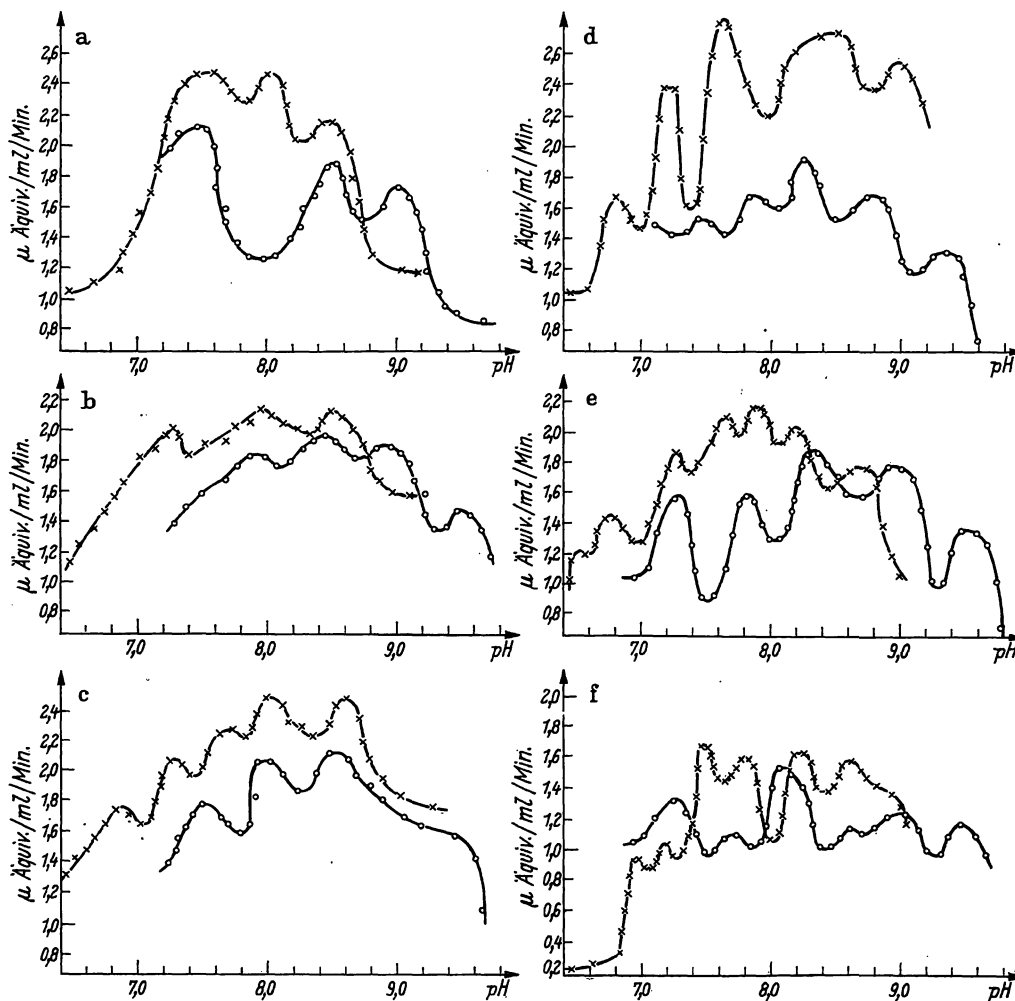


Abb. 2

Hydrolyse von Benzoylcholin durch menschliches Serum: pH-Optima in verschiedenen Zeitabständen nach Fettbelastung des Ausgangsmaterials

x—x Tris-Essigsäure-Puffer
o—o Veronalpuffer

a) am 1. Tag
b) am 2. Tag
c) am 3. Tag
d) am 6. Tag
e) am 7. Tag
f) am 8. Tag

Tab. 2
Serumanalyse des nicht mit Fett beladenen Ausgangsmaterials

| | Versuchsbeginn | 1. Tag | 3. Tag | 6. Tag | 7. Tag | 8. Tag |
|---|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Gesamte veresterte Fettsäuren (mg 100 ml) | 398 | 370 | 361 | 350,5 | 349,5 | 350 |
| Gesamt-Cholesterin (mg 100 ml) | 132 | 133 | 131 | 130 | 132 | 131 |
| Endogene Lipoproteidlipase (CE) ($\mu\text{Äquiv./l/Min.}$) | 19,7 | 18,7 | 19,2 | 20,2 | 17,9 | 18,2 |
| Arylesterase ($\mu\text{Äquiv./ml/Min.}$) | 4,2 | 4,4 | 4,3 | 4,3 | 4,3 | 4,2 |
| Dibucainzahl (DN) | 81 | 80 | 79 | 82 | 80 | 81 |

Tab. 3
Serumanalyse eines künstlich mit Nahrungsfett (Maisöl) beladenen normalen Serums

| | Ausgangsmaterial vor Fettbeladung | 1 Std. | 2 Stdn. | 1. Tag nach Fettbeladung | 3. Tag nach Fettbeladung | 6. Tag nach Fettbeladung | 7. Tag nach Fettbeladung | 8. Tag nach Fettbeladung |
|---|--------------------------------------|--------|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Gesamte veresterte Fettsäuren (mg 100 ml) | 398 | 10370 | 10210 | 10120 | 9975 | 9910 | 9860 | 9865 |
| Gesamt-Cholesterin (mg 100 ml) | 132 | 130 | 131 | 132,5 | 131 | 133,5 | 135 | 134,5 |
| Endogene Lipoproteidlipase (CE) ($\mu\text{Äquiv./l/Min.}$) | 19,7 | 6,4 | 6,1 | 6,0 | 5,0 | 2,4 | <0,7 | <0,7 |
| Arylesterase ($\mu\text{Äquiv./ml/Min.}$) | 4,2 | 1,2 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | <0,3 | <0,3 | <0,3 |
| Dibucainzahl (DN) | 81 | 46 | 47 | 48 | 47 | 45 | 46 | 45 |

nen Pufferarten eingehend studiert (1). Bei Betrachtung der Abbildungen fällt auf, daß im Ausgangsmaterial und unmittelbar nach Fettbeladung die Enzymaktivität mit dem Tris-Essigsäure-Puffer größer ist als mit Veronal-Puffer. Gegen Ende des Versuches (speziell am 7. und 8. Tag nach Fettbeladung) ist die Absoluthöhe nicht mehr von der chemischen Zusammensetzung des Puffers abhängig, sie wird jedoch geringer und sinkt etwa auf die Hälfte des Ausgangswertes ab. Wie außerdem ersichtlich, treten bereits eine Stunde nach Fettbeladung mehrere pH-Optima auf. Je länger die Fettbeladung anhält, desto größer wird die Anzahl der Optima.

Aus der Serumanalyse (Tab. 3) geht hervor, daß die Werte für das Gesamtcholesterin praktisch gleich bleiben, während eine erhebliche Menge der gesamten veresterten Fettsäuren verseift wird. Das Arylesterasesystem, das als Cofermentssystem für die endogene Lipoproteidlipase fungiert (14, 15), kommt zum Erliegen, wohl durch einen Überschuß an freien Fettsäuren, die aus Mangel an freien Tyrosin-OH-Gruppen nicht mehr umgeestert werden können (14). Freie langkettige Fettsäuren hemmen die Arylesterase des menschlichen Serums (14).

Desgleichen wird die Lipoproteidlipase zunächst stark gehemmt und ihre Aktivität schließlich gleich Null, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die entstandenen freien Fettsäuren nicht mehr über das Arylesterasesystem (14, 15) abtransportiert werden können.

Ganz andere Verhältnisse herrschen im Ausgangsmaterial (Tab. 2), das ebenfalls über die ganze Versuchsdauer (ohne Fettbeladung) analytisch verfolgt wurde. Die Ergebnisse können als Leerwerte zu den in Tabelle 3 wiedergegebenen Resultaten aufgefaßt werden. Während nach Fettbeladung nach 8 Tagen 510 mg Fettsäuren je 100 ml entstanden waren, sind es im Ausgangsmaterial nur 48 mg. Dabei kommt die Hydrolyse von Estern langkettiger Fettsäuren zwischen dem 6. und 7. Tag zum Erliegen, entsprechend einer vollständigen Hemmung der Lipoproteidlipase und der Arylesterase (Tab. 3). Wahrscheinlich ist außer diesen beiden Enzymen kein weiteres Ferment für die Esterspaltung verantwortlich. Es wäre noch denkbar, daß die enzy-

matische (16) Umwandlung von Triglyceriden (z. B. Maisöl) in Lipoproteide in einem mit Fett beladenen Serum gestört ist. Daß das nicht der Fall ist, werden wir in Kürze demonstrieren (16).

Die in Tabelle 2 wiedergegebenen Ergebnisse gehen von anderen Verhältnissen aus. Die Hydrolyse von Lipoproteiden erfolgt langsam und endet nach dem 3. Tag, weil ein Abtransport der freien Fettsäuren über die Tyrosinester nicht mehr möglich ist. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz spielt sich ein Gleichgewicht ein, wobei weder die Lipoproteidlipase noch die Arylesterase gehemmt werden. Auch bilden sich weder für die Acetylcholin- noch die Benzoylcholinhydrolyse andere oder mehrere pH-Optima aus.

Es muß bedacht werden, daß beide parallel laufenden Versuche in abgeschlossenen Systemen durchgeführt wurden. Bei dem Versuch mit Fettbeladung ist eine Seite des Gleichgewichtes (die unveresterten Fettsäuren) mit Absicht stark vergrößert worden. Trotzdem erfolgt die Einstellung des Gleichgewichts zunächst rasch (vgl. die Werte am 1. Tag nach Beladung in Tab. 3), dann jedoch immer langsamer, weil die Aktivität der zur Herstellung des Gleichgewichts notwendigen Enzyme zunächst teilweise gehemmt und schließlich gleich Null wird.

Das Absinken der Dibucainzahlen können wir nicht erklären.

Die einzige Erklärungsmöglichkeit für das Auftreten der zahlreichen pH-Optima nach Fettbeladung liegt wohl darin, daß es 11 verschiedene Benzoylcholin hydrolysierende Enzyme im menschlichen Serum gibt (2), deren pH-Optima zwischen pH 7,2 und pH 9,0 liegen. Es ist deshalb denkbar, daß einige dieser Enzyme durch das Überangebot an freien Fettsäuren gehemmt oder aktiviert werden und sich deshalb bei einer pH-Variation im Vollserum mehrere pH-Optima ausbilden.

Ob eine essentielle Hyperlipämie oder eine künstliche Fettbeladung des Serums das Auftreten von mehreren pH-Optima für die Arylesterase bewirkt, wird derzeit untersucht.

Eine endgültige Klärung kann erst die Untersuchung des Einflusses von freien langkettigen Fettsäuren auf die isolierten Einzelenzyme bringen, woran derzeit bei uns gearbeitet wird.

Literatur

1. PILZ, W. und A. T. BOO, diese Z. 5., 173 (1967). — 2. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 80 (1966). — 3. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 215, 105 (1965). — 4. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 193, 338 (1963). — 5. ZLATKIS, A., B. ZACK und A. J. BOYLE, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 41, 486 (1953). — 6. PILZ, W., Z. analyt. Chem., im Druck. — 7. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 212 (1963). — 8. HÖRLEIN, H. und W. PILZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 256 (1962); PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 212 (1963). — 9. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962); PILZ, W., Mikrochim. Acta (Wien), 614 (1961). — 10. PILZ, W., Zschr. exper. Med. 132, 310 (1959). — 11. PILZ, W. und I. JOHANN, diese Z. 4, 215 (1966). — 12. KALOW, W. und K. GENEST, Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 339 (1957). — 13. PILZ, W., I. JOHANN und E. STELZL, Klin. Wschr., 43, 1227 (1965). — 14. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 335, 221 (1964). — 15. PILZ, W., H. HÖRLEIN und E. STELZL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 345, 65 (1956). — 16. PILZ, W., in Vorbereitung.

Dr. W. Pilz
509 Leverkusen-Bayerwerk

Ein neuer Redoxkatalysator für die Blutzuckerbestimmung mit Glucoseoxydase

Von A. HÄRTEL, K. FABEL-SCHULTE, H. LANG und W. RICK

*Aus der Biochemischen Abteilung der E. Merck AG Darmstadt und der 1. Medizinischen Universitätsklinik Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. Grosse-Brockhoff)*

(Eingegangen am 25. April 1967)

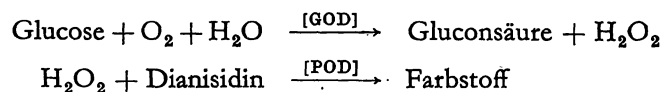
Für die Blutzuckerbestimmung mit Glucoseoxydase kann an Stelle der bisher gebräuchlichen Peroxydase ein Gemisch von Jodid und Vanadat verwendet werden. In bezug auf Farbausbeute, Reaktionsgeschwindigkeit und Störanfälligkeit ist dieser anorganische Katalysator der Peroxydase gleichwertig, er übertrifft sie in bezug auf Haltbarkeit. Die Erprobung unter Routinebedingungen zeigt, daß das Verfahren gut für das Kliniklaboratorium geeignet ist und die Ergebnisse mit denen der Glucoseoxydase/Peroxydase- und der Hexokinase-Methode übereinstimmen.

In the determination of blood sugar with glucose oxidase, the hitherto used peroxidase can be replaced by a mixture of iodide and vanadate. This inorganic catalyst is equal to peroxidase in colour yield, rate of reaction and susceptibility to interference, and it is more stable. Tests under routine conditions show that the method is well suited to the clinical laboratory, and the results agree with those from the glucose oxidase/peroxidase and the hexokinase methods.

Für die Routine-Blutzuckerbestimmung werden heute vor allem zwei Verfahren empfohlen: Die o-Toluidin-Methode und das Glucoseoxydase¹⁾-Verfahren.

Die o-Toluidin-Methode zeichnet sich durch eine erstaunlich hohe Spezifität aus (1—7). Es werden praktisch nur Aldohexosen erfaßt, so daß man nur bei dem seltenen Krankheitsbild der Galaktosämie und nach Belastung mit Galaktose mit Störungen rechnen muß.

Die im zweiten Verfahren angewendete Glucoseoxydase (GOD) wird gern als Musterbeispiel für eine hohe Spezifität angegeben, da sie außer Glucose nur sehr wenige andere Verbindungen — und diese mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit — oxydiert. Es bildet sich bei dieser Reaktion H_2O_2 , das sich leicht durch Dianisidin oder Toluidin in Gegenwart von Peroxydase (POD) nachweisen läßt:



¹⁾ Der Trivialname Glucoseoxydase wird hier gebraucht für das Enzym β -D-Glucose : O_2 -Oxydoreduktase EC 1.1.3.4; Peroxydase für Donor : H_2O_2 -Oxydoreduktase EC 1.11.1.7; Hexokinase für ATP : D-Hexose-6-phosphotransferase EC 2.7.1.1.

Wegen der Spezifität der Glucoseoxydase-Reaktion hat man diese Bestimmung häufig als sehr genau angesehen: In manchen Fällen zu Unrecht, denn die Indikatorreaktion mit Peroxydase als solche ist unspezifisch. In Gegenwart von oxydierenden Substanzen, die schon durch geringe Verunreinigungen in die Probe gelangen können, können die Werte zu hoch ausfallen (8—9). Außerdem überträgt die Peroxydase das H_2O_2 auch auf viele andere Verbindungen (10) (z. B. auf Ascorbinsäure und Harnsäure), wodurch etwas zu tiefe Werte vorgetäuscht werden. Ferner enthalten handelsübliche Glucoseoxydase-Präparate häufig noch eine geringe Maltase-, Amylase- und Saccharase-Aktivität (11—15). Durch diese Fehlermöglichkeiten kann es trotz der hohen Spezifität der reinen Glucoseoxydase zu Abweichungen von den richtigen Glucose-Werten kommen.

Für Routinebestimmungen und für viele andere Zwecke ist die Genauigkeit der Glucoseoxydase-Methode jedoch völlig ausreichend. Das Verfahren besitzt den Vorteil, daß es bei Zimmertemperatur durchgeführt werden kann. Schwierigkeiten treten im Vergleich zur o-Toluidin-Methode vor allem in bezug auf die Haltbarkeit auf: